Ursachen der Myzelbildung bei Ustilago Jensenii (Rostr.)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

EINER

HOHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER

EBERHARD-KARLS-UNIVERSIÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON

ERNST HILS
AUS HALENSEE.

ACAD.
LUGD BAT.
BIBL.

Berlin 1912
Emil Ebering
Mittelstraße 39.

Von der Fakultät angenommen am 8. Februar 1912.

Meinen Eltern

Die Ustilagineen sind in vielen Arten verbreitet. Sie treten als Parasiten höherer Pflanzen, beonders der Gramineen auf. Verschiedene von ihnen sind lange bekannt, weil sie gefährliche Schädlinge unserer Getreidegräser darstellen. Man faßte sie früher unter dem Namen Ustilago Carbo zusammen, da sie sich weithin bemerkbar machen durch die dunklen Polster von Brandsporen, die an verschiedenen Teilen der von ihnen befallenen Pflanze hervortreten. Spätere Untersuchungen haben ergeben, daß wir es mit einer ganzen Anzahl von verschiedenen Arten zu tun haben, die morphologisch und physiologisch zum Teil erheblich von einander abweichen. Der Kampf, den man gegen diese Verwüster unserer Getreidekörner zu führen gezwungen war, hat es mit sich gebracht, daß sich die Studien namhafter Botaniker auf die Ustilagineen gerichtet haben.

Brefeld verdanken wir es in erster Linie, daß wir heute mit dem Entwicklungsgange dieser Pilze bekannt sind und auch den Infektionsvorgang bei den wichtigsten kennen. Seine genauen und umfassenden Ergebnisse beruhen zum großen Teil auf der sorgfältigen Anwendung von Reinkulturen; wir finden sie im 5., 11. und 13. Bande seiner „Mykologischen Untersuchungen".

Wir wissen jetzt, daß die dunklen Brandsporenlager, die an den verschiedensten Stellen der Wirtspflanze auftreten können, die Endprodukte einer gewissen vegetativen Ent-

wicklung des Pilzes sind. In den meisten Fällen gelangt die Brandspore auf den Erdboden, keimt hier mit einem Myzel oder Promyzel aus, das seinerseits zur Abschnürung von Konidien schreitet in Formen, die bei den einzelnen Arten des Pilzes sehr verschieden sein können. Diese Konidien gelangen nun durch Ursachen, die ihrem Bau und ihren sonstigen Eigenschaften entsprechen, auf ihren Wirt und veranlassen die Infektion. So finden wir Konidien, die in der Luft abgeschnürt werden, um durch den Wind fortgetragen zu werden (Ust. Maydis), und andere, die auf feuchtem Wege an ihre Wirtspflanze gelangen müssen.

Zu der letzteren Art gehört auch Ustilago Jensenii, ein Pilz, der die Gerste oft in außerordentlichem Maße befällt und so den Körnerertrag bedeutend herabmindert. Der Infektionsvorgang ist hier derselbe wie bei Ustilago avenae. Da ich mich in meiner Arbeit hierauf oft beziehen muß, möge es mir gestattet sein, ihn kurz an dieser Stelle zu skizzieren.

Die Keimung der Brandspore erfolgt unter dem Einflusse der Feuchtigkeit. Es wird ein meistens dreizelliges Promyzel gebildet. Während nun in reinem Wasser das Promyzel nur an den Scheidewänden der einzelnen Zellen und an der Spitze Konidien abschnürt, die sich nicht oder nur in beschränkter Weise weiter teilen, setzt in einer Nährlösung eine lebhafte Teilung der Konidien ein, so daß ein Vegetationsbild entsteht, das einer Hefesprossung ähnlich ist. Diese Konidien kommen mit der jungen Pflanze in Berührung und führen die Infektion herbei. Die Kutikula wird gelöst und in das Innere der Pflanze dringt der Pilz mit einer Hyphe ein. Der Parasit ist auf junge Zellen der Wirts-

pflanze angewiesen. Kann seine Entwicklung mit der der infizierten Pflanze nicht Schritt halten, so sterben seine Hyphen ab. Ist dies aber der Fall, so bildet der Pilz, sobald das Scheitelwachstum aufgehört hat und der Blütenstand angelegt ist, seine Brandsporen.

An diesem Entwicklungsgang scheint mir nun der Umstand so merkwürdig, daß der Pilz, der außerhalb der Wirtspflanze in Hefesprossung vegetiert, die Bildung von Konidien in der Wirtspflanze ganz zu unterlassen scheint. Die Umstände, die den Pilz zu diesem Wachstumsunterschied veranlassen, sind bis jetzt, soviel ich in Erfahrung bringen konnte, nirgends untersucht worden, und dennoch scheint mir die Frage einige Wichtigkeit zu besitzen, weil doch gerade von der Ausbildung des Myzels und seinem Wachstum das vollständige Gelingen der Infektion und die Ausbildung der Brandsporen abhängt.

Darüber, unter welchen Bedingungen von den Promyzelkeimern der Ustilagineen überhaupt Myzel gebildet werden kann, habe ich nur an zwei Stellen kurze Erwähnung gefunden. 1. Einmal bei Brefeld im 5. Bande der Mykolog. Untersuchungen, wo berichtet wird, daß Ustilago avenae bei Erschöpfung des Nährmaterials zur Myzelbildung schreitet. 2. Eine zweite kurze Notiz findet sich über den Gegenstand bei Herzberg (Vergleichende Untersuchungen über landwirtschaftlich-wichtige Flugbrandarten, bei Zopf, Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen 1895). Hier wird in einer Randbemerkung erwähnt, daß, wenn Ustilago Jensenii als Stickstoffquelle Ammoniumsulfat geboten wird, nicht wie sonst eine Hefesprossung, sondern die Ausbildung eines Myzels erfolgt.

Was den Nährstoffmangel betrifft, so kann er meiner Meinung nach nicht der Grund für die Myzelbildung sein, denn der Pilz findet doch in den Pflanzenzellen hinreichend Nährmaterial, besonders in den jungen Zellen, auf die er angewiesen ist. — Aber auch die Darbietung des Ammoniumsulfates scheint mir nicht die in Frage kommende Veranlassung zu sein, denn die überwiegende Menge des Stickstoffes wird der Pilz im Plasma in Form von Eiweißstoffen vorfinden.

Die vorliegende Arbeit will versuchen, der Lösung der Frage: „Wann bildet der Ustilago Jensenii unter Bedingungen, die denen in der Wirtspflanze entsprechen, Myzel?“ einen Schritt näher zu kommen.

Die Untersuchungen wurden im pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Berlin ausgeführt.

Das Material nahm ich von einer brandigen Gerstenähre, die im Juli 1910 auf dem Versuchsfelde der landwirtschaftlichen Hochschule in Dahlem gesammelt worden war.

Nährböden.

Um Wiederholungen zu vermeiden, will ich folgendes vorausschicken. Für die Kultur des Pilzes wurden zwei Arten von Nährböden benutzt, wässrige und gallertartige. Ich glaubte beide nehmen zu müssen, da ich aus Vorversuchen ersehen hatte, daß die Wuchsformen auf beiden bisweilen Verschiedenheiten aufwiesen. Ferner hat ein wässriger Nährboden den Vorteil, daß die Aufnahmefähigkeit für Nährstoffe eine bessere ist als bei gallertartigen (die bisweilen nicht erstarrten), und daß bei geeigneter

Anordnung eine Durchmusterung der gesamten Kultur möglich war. Gallertartige Nährböden gestatteten dagegen wieder eine bessere Einsicht in den Entwicklungsverlauf, insofern als zusammengehörige Teile bei einander blieben. Die zweifache Art der Nährböden schien mir zur Kontrolle nötig zu sein, um Einflüsse festzustellen, die von der Art des Substrates ausgingen.

Wenn nicht besonders angegeben, wurde den Lösungen zur Beschaffung der nötigen Aschenbestandteile Magnesiumsulfat, Monokaliumphosphat, Chlornatrium und Chlorkalzium in folgender Konzentration zugesetzt:

KH_2PO_4	0,2 %,
$MgSO_4$	0,1 %,
NaCl	0,1 %,
$CaCl_2$	0,1 %.

Als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle benutzte ich Traubenzucker bezw. Pepton (Witte). Ich wählte besonders diese beiden Stoffe, weil ich damit der Nährstoffzusammensetzung des Zellinhaltes am nächsten zu kommen hoffte und ich nicht durch Wechsel der Nährmedien unkontrollierbare Nebenumstände hineinbekommen wollte. Daneben meinte ich auch das Wachstum auf Ammoniumsulfat untersuchen zu müssen, da ich hierbei, wie oben erwähnt, Myzel erhielt und ich so die Möglichkeit hatte, die Myzelbildung zu verfolgen, verschiedene Formen festzustellen und Uebergänge zu beobachten.

Morphologischer Abschnitt.

Da ich außer den oben erwähnten Resultaten Brefelds

und Herzbergs keinen Anhalt nach irgendeiner Richtung hatte, suchte ich zuerst durch genaues Beobachten verschiedener Kulturen Kenntnis von den verschiedenen Wuchsformen des Pilzes zu gewinnen. Mein Arbeitsfeld war, was die Art der Nährstoffe betrifft, begrenzt durch die Untersuchungen von Herzberg, der den Einfluß verschiedener N- und C-Quellen, ohne allerdings auf Konzentrationsänderungen einzugehen, festgestellt hatte. Brefeld hat Genaueres über die Zusammensetzung der Nährböden nicht angegeben; es waren wässrige Lösungen.

Wasserkulturen mit Peptonzusatz.

Die Wasserkulturen führte ich anfangs in der feuchten Kammer auf Objektträgern aus. Auf einem Teller stand ein Zinkgestell und auf dieses wurden einige durch Reinigen mit Alkohol und Abflammen steril gemachte Objektträger gebracht. Die sterile Nährflüssigkeit wurde in größeren Tropfen auf die Objektträger verteilt. Das Ganze war von einer Glasglocke bedeckt, die innen zur Verhinderung der Austrocknung von mit Wasser durchtränktem Fließpapier bekleidet war.

Die Nährlösungen enthielten außer den oben erwähnten Stoffen:

1. 0,5 % Pepton und 2 % Dextrose,
2. 1,0 % „ „ 2 % „
3. 3,0 % „ „ 2 % „

Es wurde mit Brandsporen geimpft. Temperatur 18 bis 21 Grad Celsius.

Die Keimung der Sporen war (schon nach 24 Stunden) außerordentlich reichlich. Es keimten fast alle aus und schnürten eine große Anzahl von Konidien ab, die zum Teil frei in der Flüssigkeit schwammen, zum Teil noch am Promyzel hingen. Viele Konidien sind im Begriff sich weiter zu teilen. Wir haben also das Bild, das uns Brefeld genau beschrieben hat. Das Wachstumsbild war bei allen Nährlösungen fast das gleiche, eine fortwährende Teilung der Konidien (Hefesprossung). Siehe Fig. 1.

Figur 1.

1, 2, 3. Brandsporen, in Peptonwasser auskeimend.
4, 5, 6. Konidienverbände und einzelne Konidien von Kulturen auf Pepton-Dextrose-Gelatine.

Kulturen auf Pepton-Dextrose-Gelatine.

Es wurden dieselben Nährlösungen wie eben unter Zusatz von 10 % Gelatine benutzt, außerdem Gelatine 1. ohne jeden Nährstoffzusatz und 2. mit Zusatz von Dextrose allein. Die Gelatine war auch ohne Klärung so durchsichtig, daß man ohne Schwierigkeit beobachten konnte. Auch von der Neutralisierung der sauren Gelatine wurde Abstand genommen. Die Nährgelatine wurde in Röhrchen gegossen, die

oben in bekannter Weise durch einen Wattepfropfen verschlossen waren. Die Sterilisation erfolgte im Dampftopf an drei aufeinander folgenden Tagen je 15 Min. bei 100°. Die Gelatine ließ ich in Röhrchen in schräger Fläche erstarren und impfte dann durch Strich mit der infizierten Nadel. Reines Konidienmaterial hatte ich mir durch Plattengießen mit Pepton-Dextrose-Gelatine verschafft. Die Röhrchen wurden im Dunkeln bei 19—20° C. aufgestellt.

Die Entwicklung war schon nach wenigen Tagen recht üppig, am besten in den Kulturen, die reichlicher mit Pepton versehen waren. Auch in den Kulturen, denen nur Zucker und kein Pepton zur Verfügung stand, war die Entwicklung nicht schlecht. Etwas zurück blieben jedoch die Kulturen in den Röhrchen, die weder Zucker noch Pepton enthielten.

Vom Strich aus wuchs nach beiden Seiten eine schleimige, glänzende Schicht. Wie das Mikroskop zeigte, bestand sie aus einzelnen Konidien und aus Konidienverbänden. (Fig. 1, (4, 5, 6).)

Bei allen Kulturen zeigte sich nun mehr oder weniger die merkwürdige Erscheinung, daß von dem mittleren Strich nach beiden Seiten hin und in das Substrat hinein weiße Strahlen ausgingen, so daß man den Eindruck gewann, als ob hier eine Myzelbildung vorläge (s. Fig. 1a). In dem oberen Teile der Gelatine, da, wo sie nicht sehr dick war, zeigten diese Strahlen eine auffallend parallele Richtung. Zur Untersuchung schnitt ich eine dünne Gelatineschicht, die von solchen Strahlen bedeckt war, heraus und beobachtete das Ganze unter dem Mikroskop. Es zeigte sich, daß diese Strahlen aus perlschnurartig aneinander gereihten

Figur 1 a.

Wuchsform einer Strichkultur auf Pepton-Zucker-Gelatine mit reicher Strahlenbildung.

Konidienhäufchen bestanden, die durch zarte bisweilen kaum sichtbare Myzelfäden mit einander verbunden waren (Fig. 3). Sehr reduziert sahen diese Reihen auf der Gelatine ohne besonderen Nährstoffzusatz aus. Hier schloß sich nur immer Zelle an Zelle; zur Bildung von Konidienhaufen kam es nicht. (Fig. 4.)

Es kommt also hier auf Pepton zur Entwicklung von Hyphen. Nach dem Vegetationsbilde (Fig. 3) scheinen hier von Zeit zu Zeit Reize aufzutreten, die eine Myzelbildung befördern. Ich vermutete Tag- und Nachtformen; andererseits lag die Möglichkeit nahe, daß, wenn der Pilz an einer Stelle kräftig vegetiert hat, einzelne Konidien, veranlaßt durch Stoffwechselprodukte, zu Hyphen auswachsen, die in einigem Abstande, wo diese Produkte nicht mehr wirksam sind, wieder zur Konidienbildung übergehen. Ueber

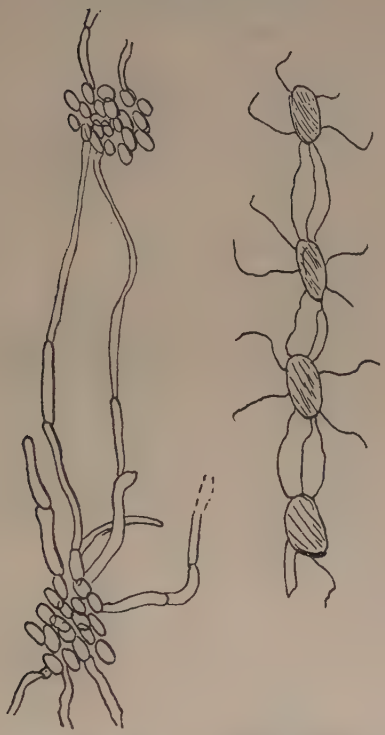
Figur 2.

Hyphenartige Zellverbände aus Peptonkulturen. (Reihen.)

die Versuche, die ich in dieser Richtung anstellte, werde ich im physiologischen Abschnitt berichten.

Neben diesen Hyphenbildungen beobachtete ich oft, daß über den Rand des Striches auf der Gelatine Zellreihen hinauswuchsen. Diese hatten das Aussehen mehr oder weniger stark septierter Hyphen. Einzelne Teile davon waren dünn und entleert (s. Fig. 2). Im allgemeinen hat man in diesen Zellreihen wohl keine echten Hyphen vor sich. Sie

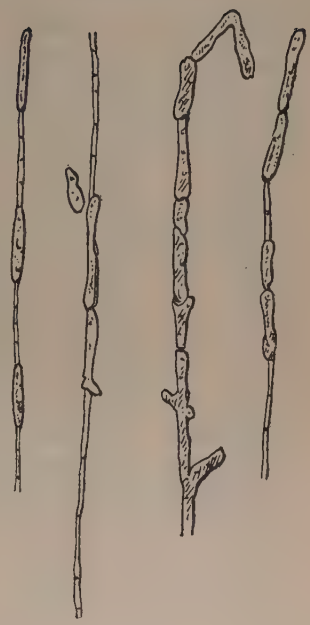
Figur 3.



Ein Abschnitt eines Strahles. Vergrößerung der in Fig. 1a dargestellten Strahlen.

Schematisches Bild eines Srahles.

Figur 4.



Reduzierte Strahlen auf Gelatine ohne bes. Nährstoffzusatz.

zeigen uns nur die Sproßfolge der nacheinander entstandenen Konidien. Der gallertartige Nährboden ist es, der verhindert, daß sich die Konidien voneinander lösen. Schmilzt man vorsichtig einen Teil der Gelatine, die solche Zellreihen trägt, so verschwindet die Anordnung, das Mikroskop zeigt nur noch regellos verteilte Konidien oder Konidienverbände bis zu 6 Konidien.

Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle.

Wässerige Nährböden.

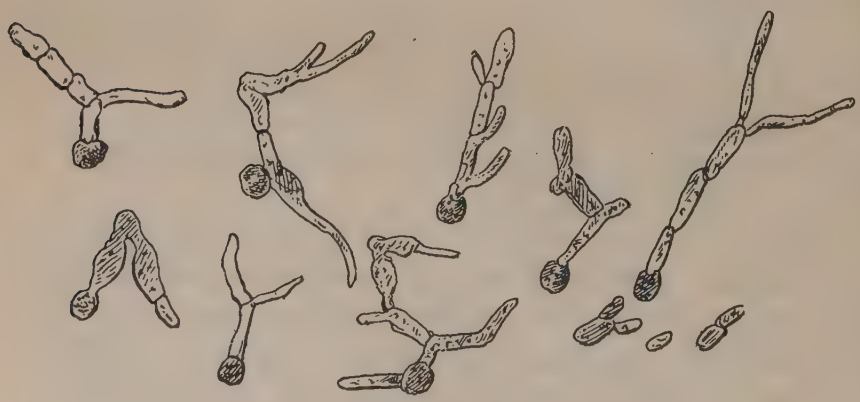
Die Kulturen wurden hier ebenso angesetzt, wie die Kulturen mit Pepton, in der feuchten Kammer. Die Brandsporen keimten bei einer Temperatur von 20° in 1 bis 2 Tagen gut aus.

Ich benutzte als Nährlösungen solche mit

1. 4 % Ammoniumsulfat und 2 % Dextrose,
2. 1 % Ammoniumsulfat und 2 % Dextrose,
3. 0,05 % Ammoniumsulfat und 2 % Dextrose.

Bei der Kultur 3. war die Auskeimung nicht so lebhaft wie sonst. Noch nach acht Tagen war eine beträchtliche Anzahl nicht ausgekeimt. Dagegen war die Schnallenbildung hier sehr stark (Fig. 5).

Figur 5.



Brandsporen in Ammoniumsulfat auskeimend.

Es entsteht also nicht Myzel ausschließlich, sondern die Versuche zeigten vielmehr, daß durch Ammoniumsulfat

Wuchsformen hervorgerufen werden, die denen sehr ähnlich sind, die man erhält, wenn man die Auskeimung in reinem Wasser erfolgen läßt, wie Brefeld auch schon für Ust. avenae ausführlich beschrieben hat. Der Unterschied besteht darin, daß das Wachstum schneller vor sich geht aber doch schließlich zu ähnlichen Formen führt.

Es scheint demnach, daß durch die Darbietung des Stickstoffs im Ammoniumsulfat der Pilz nicht hinreichend ernährt wird und sich in einem gewissen Hungerzustande befindet, der etwas milder ist, als wenn nur reines Wasser geboten wird.

Um festzustellen, ob dem Ammoniumsulfat die Rolle eines Reizmittels zukam, stellte ich Versuche mit einem Gemisch von Ammoniumsulfat und Pepton (2 % Ammoniumsulfat und 1 % Pepton) an und fand, daß der Pilz sich jetzt ebenso verhielt, wie wenn ihm Pepton allein geboten wird. Von einem Reiz kann also nicht die Rede sein.

Kulturen in Doppelschalen.

Um die Entwicklung des Myzels längere Zeit verfolgen zu können, erwies sich die Kulturmethode in der feuchten Kammer als ungenügend; denn schließlich verdunstete doch ein Teil der Nährlösung und wenn das Fließpapier, das die Glocke innen bekleidete, von neuem befeuchtet wurde, schlug sich leicht Kondenswasser auf den Objektträgern nieder. Auch war das Sterilhalten für längere Zeit sehr schwierig. Um diesen Uebelstand zu vermeiden, entschloß ich mich, zur Kultur kleine Doppelschalen, nach Art der Petrischalen, von ungefähr 3 cm Durchmesser und 2 cm

Höhe zu verwenden. Diese wurden ungefähr $^1/_3$ bis $^1/_4$ mit Nährlösung gefüllt.

Ich wählte auch hier obige Nährflüssigkeiten und sterilisierte an 3 Tagen im Dampftopf und impfte von Pepton-Dextrose-Gelatine mit Konidien.

Die Beobachtung der Kultur geschah dadurch, daß ich auf die Flüssigkeit ein großes, rundes Deckgläschen legte und nun die Kultur mit dem Mikroskop durchmusterte.

Die Temperatur betrug während der Kultur 19—21 ^{0} C.

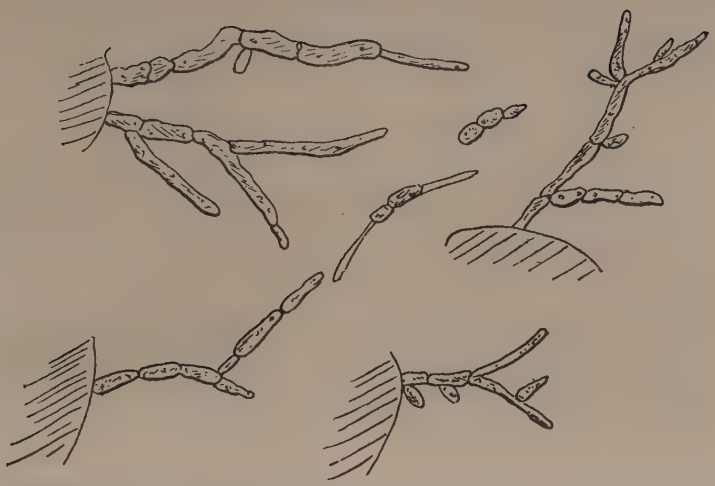
Nach 10 Tagen war die Entwicklung im allgemeinen eine recht gute; bei den Kulturen mit geringem Ammoniumsulfatgehalt eine schwächere.

In der Flüssigkeit sah man weißliche Flocken schwimmen. Der Boden des Gefäßes war oft mit einem Satz bedeckt. Das Mikroskop zeigte, daß die Flocken aus Myzel bestanden. Die Hyphen waren teils in offenmaschigen, breiten Flächen miteinander verbunden, teils dicht verflochten, so daß man nur diejenigen gut beobachten konnte, die über den Rand hinausragten. Zum Teil waren auch kleinere Verbände zu beobachten, in denen die Hyphen strahlenförmig von einem Zentrum auszugehen schienen.

Daneben fanden sich auch überall Konidien in größerer oder geringerer Zahl. Wenn ein Bodenbelag vorhanden war, so stellte er sich stets als aus Konidien bestehend dar.

Die Abbildungen Fig. 6 zeigen, daß das Myzel, wie es hier entsteht, doch verschieden ist von dem bei den Kulturen mit Pepton Fig. 2, 3 und 4. Die Hyphen sind hier gleichmäßig schlank, verzweigt, dabei nicht so dünn wie beim Pepton und selten entleert. Sie hatten mehr das

Figur 6.



Myzelbildungen auf älteren Ammoniumsulfat-Kulturen. Die schraffierten Flächen sollen die dichten Verflechtungen darstellen, die sich nicht entwirren ließen.

Aussehen von normalen Hyphen, wie sie bei niederen Pilzen gewöhnlich vorkommen.

Kulturen auf Agar-Agar.

Als gallertartigen Nährboden konnte ich bei Ammoniumsulfat Gelatine nicht benutzen, da, wie ich oben gezeigt habe, der Pilz mit der Gelatine ohne besondere Stickstoff- und Kohlenstoffquelle auszukommen imstande war. Ich griff deshalb zu Agar-Agar, nachdem ich festgestellt hatte, daß auf reinem Agar ohne Zusatz von Nährstoffen eine Entwicklung nicht erfolgte.

Benutzt wurden wieder jene drei Nährlösungen unter Zusatz von 1,5 % Agar. Die Sterilisation erfolgte im Auto-

klaven bei einem Ueberdruck von 1,5 Atmosphären. Einen höheren Druck konnte ich nicht nehmen, da sonst der Agar wegen der sauren Reaktion der Nährflüssigkeit nicht mehr erstarrte. Auch bei diesem Ueberdruck blieb er schon ziemlich weich, hielt sich jedoch noch recht gut.

Die Temperatur während der Kultur betrug 19—20° C.

Die Entwicklung war eine normale. Es bildete sich ein breiter Strich, ohne daß jedoch die bei den Pepton-Gelatinekulturen so charakteristischen Strahlen auftraten. Das Myzel entwickelte sich hier nicht so lang wie bei den Wasserkulturen, Konidien scheinen dagegen reichlicher gebildet zu werden. Im allgemeinen ist das Vegetationsbild dasselbe.

Physiologischer Abschnitt.

Ich hatte aus den vorhergehenden Versuchen gesehen, daß bei Peptonzusatz eine besondere Art von Hyphen entstand, auch wenn nicht von einem Hungerzustande gesprochen werden konnte, und andererseits beobachtet, daß auch bei Zusatz von Ammoniumsulfat Konidien gebildet wurden. Meine weitere Aufgabe bestand jetzt darin, die Tatsachen festzustellen, die die Hyphenbildung veranlassen und durch Einwirkung verschiedener Mittel die Herausbildung eines echten Myzels bei Anwesenheit von Eiweißstoffen zu versuchen.

Als solche Mittel waren anzusehen:

1. verschiedene Konzentration der Nährböden sowohl hinsichtlich des Zuckergehaltes als auch des Eiweißgehaltes;

2. die Verwendung von Atmosphären, die reicher oder ärmer an Sauerstoff waren als die gewöhnliche Luft;
3. das Licht;
4. saure, neutrale und alkalische Nährböden;
5. Züchtigung des Pilzes auf Zellulose.

Hinsichtlich der Temperatur habe ich keine Untersuchungen angestellt. Herzberg berichtet zwar, daß z. B. Ust. avenae bei 30° C. mehr Neigung zur Myzelbildung zeigt als bei niederen Temperaturen. Aber Ust. Jensenii wächst ja in seiner natürlichen Umgebung bei geringeren und sich ändernden Temperaturen zu Myzel aus, und die Temperatur im Innern der Gerste wird von der der Umgebung nicht so bedeutend abweichen.

Was die Nährböden anbetrifft, so wurden auch jetzt sowohl wässrige als gallertartige angewendet.

Die Aenderung des Sauerstoffgehaltes der Luft wurde folgendermaßen bewirkt. In eine breite Glasschale wurde eine Glasglocke gesetzt, die oben durch einen zweifach durchbohrten Gummistopfen geschlossen war. Durch diesen gingen zwei Glasröhren, von denen die eine nur in den oberen Raum der Glocke hineinragte, während die andere an der Wand der Glocken entlang bis nahe dem Boden geführt wurde. Um der Luft in der Glocke die gewünschte Zusammensetzung zu geben, wurde durch das längere Rohr ein Sauerstoffstrom eingeleitet. Das Gas wurde einer Bombe mit verdichtetem Sauerstoff entnommen und mit geringem Ueberdruck eine halbe Minute hindurchgeleitet. Hiernach wurden die Oeffnungen der Glasröhren durch Gummischläuche, in denen

massive Glasstöpsel saßen, verschlossen. Zwischen Glocke und Teller war mit flüssigem Paraffin gedichtet worden.

Eine ähnliche Einrichtung wurde benutzt, um eine an Sauerstoff arme Atmosphäre herzustellen. An Stelle von Sauerstoff wurde jetzt Wasserstoff, den ich ebenfalls einer Bombe entnahm, in die Glocke hineingeleitet. Dadurch wurde ein Teil der Luft und damit des Sauerstoffes verdrängt, und an dessen Stelle trat der physiologisch inaktive Wasserstoff.

Zur Feststellung der Wirkung der Belichtung wurden die Wasserkulturen einfach dem Tageslicht ausgesetzt. Da jedoch die Kürze des Wintertages und die starke Bewölkung die Belichtungs-Dauer und -Stärke gar zu sehr herabsetzten, nahm ich bei den Gelatinekulturen künstliches Licht zu Hilfe. Ich stellte die Röhrchen halbkreisförmig in 60 cm Entfernung von einer tausendkerzigen Bogenlampe auf. Die Lampe brannte von morgens 9 bis abends 6 Uhr. Ihre Wärmewirkung war durch Wasserkuvetten von 5 cm Wasserschicht abgeschirmt. Um die Erwärmung des Wassers zu verhindern, führte ich durch die Kuvetten U-förmig gebogene Glasröhren, durch die fortwährend Wasser aus der Wasserleitung hindurchfloß. Der Wasserstrom ließ sich leicht so regulieren, daß eine Temperaturerhöhung nicht eintrat.

Einflüsse der Nährstoffkonzentration bei gleichzeitiger Aenderung des Sauerstoffgehaltes der Luft und der Beleuchtungsstärke.

Um die Resultate einwandfrei vergleichen zu können, hielt ich es für notwendig, soweit als möglich, die Versuche

parallel auszuführen. Nur so hatte ich die Gewißheit, die Ursachen verschiedener Formbildung zu erkennen. So sind von den in den untenstehenden Tabellen beschriebenen Kulturen gleichzeitig angestellt:

1. die in Wasser, unter Zusatz von Pepton und Ammoniumsulfat;
2. sämtliche Kulturen auf Pepton-Gelatine;
3. sämtliche Kulturen auf Ammoniumsulfat-Agar.

Jede Kultur wurde der Kontrolle wegen doppelt angesetzt. Die Anzahl der gleichzeitigen Kulturen war infolgedessen eine bedeutende und es erklärt sich, daß ich mich bei den Wasserkulturen, die ich in Doppelschälchen ausführte, in der Zahl mehr beschränkte als bei den Gelatinekulturen.

Damit ich die Gewähr hatte, daß die Nährflüssigkeit in den Doppelschalen mit den Gasen hinreichend in Berührung kam, mußte ich verhindern, daß die obere Schale dicht auf der unteren lag. Dies erreichte ich dadurch, daß ich schräg in die untere einen Glasstab legte, welcher so groß war, daß sein oberes Ende gerade auf dem Rande der unteren Schale lag, so daß die obere etwas angehoben war, dabei aber die untere doch gut bedeckte. Um ferner die große Anzahl der Schalen unter einer Glocke von mäßigem Umfang bequem und zweckmäßig unterbringen zu können, wurden die Schälchen aufgestapelt zwischen Holzstäbchen, die senkrecht in eine kleine Schale eingegypst waren.

Die Gelatinenährböden wurden durch Zusatz von 10 % Gelatine zu den Nährlösungen erhalten. Das anfänglich ziemlich saure Substrat wurde durch Zusatz von Natrium-

karbonat s c h w a c h sauer gemacht. Die Nährgelatine wurde in Röhrchen gegossen und an drei Tagen je 15 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Verschlossen waren die Röhrchen mit Pfropfen aus nicht entfetteter Watte, bei der der Gasaustausch besser vonstatten ging als bei Anwendung entfetteter Watte. Geimpft wurde im Strich.

Für gallertartige Nährböden mit Ammoniumsulfat wurde ein Zusatz von 1,5 % Agar-Agar genommen. Der Agar blieb ziemlich weich und sonderte im unteren Teil geringe Mengen von Flüssigkeit ab.

Der besseren Uebersicht wegen habe ich die Ergebnisse in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Es bezieht sich
die Rubrik D auf die Kulturen im Dunklen,
die Rubrik L auf die Kulturen im Licht,
die Rubrik H auf die Kulturen in der an Sauerstoff ärmeren Atmosphäre,
die Rubrik O auf die Kulturen in der an Sauerstoff reicheren Atmosphäre.

Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle.

Die Kulturen zeigen auf Agar-Agar eine stark gebuchtete, schorfige Form. Ein Eindringen in das Substrat findet nicht statt, sondern die ganze Kultur wächst mit der Zeit in die Höhe und kann schließlich in ihrer Gesamtheit abgehoben werden, Merkmale, die von Herzberg als charakteristisch für Ust. Jensenii angegeben werden.

Die Tabelle zeigt, daß das Ammoniumsulfat nicht nur Myzelbildung veranlaßt, sondern, daß fast überall Konidien

Kulturen mit Ammoniumsulfat als Sickstoffquelle.

a) Wässeriger Nährboden.

(E. = Entwicklung, M. = Myzel, K. = Konidien).

	Licht	dunkel	H	O
0,5 % Ams. u. 2 % Zucker	E. mittel M. } vorhanden K. }	E. mittel M. } vorhanden K. }	E. mittel M. vorhanden K. vorhanden	E. mittel M. entwickelt K. keine
3 % Ams. + 0,2 % Zucker	E. mittel M. } vorhanden K. }	E. mittel M. } vorhanden K. }	E. sehr schwach M. — K. vorhanden	E. schwach K. vorhanden
3 % Ams. + 0,5 % Zucker	E. mittel M. vorwiegend K. vorhanden	E. gut M. überw., gut ausgeb. K. vorhanden	E. schwach M — K. vorhanden	E. mittel M. Reihen K. vorhanden
3 % Ams. + 2 % Zucker	E. gut M. vorhanden K. vorhanden	E. gut M. } vorhanden K. }	E. mittel M. } vorhanden K. }	E. gut M. vorwiegend K. vorhanden
3 % Ams. + 5 % Zucker	E. sehr gut M. nicht vorhanden K. vorhanden	E. mittel M. — K. vorhanden	E. fast null M. nicht vorhanden K. vorhanden	E. schwach M. } vorhanden K. }
3 % Ams. + 10 % Zucker	E. sehr gut M. nicht vorhanden K. vorhanden	E. sehr gut K. vorhanden	E. sehr schwach K. einige	E. sehr schwach
10 % Ammonium-sulfat 2 % Zucker	E. gut M. vorhand. überwieg. K. —	E. gut M. vorwiegend K —	E. schwach M. vorwiegend K. —	E. mittel M. nicht beobachtet K. vorhanden

b) Kulturen auf Agar-Agar.

	Dunkel	H	O
0,2 % $(NH_4)_2SO_4$ und 0,2 % Zucker	E. gut M. lange Hyphen z. T. stark sept. K. keine	E. gut M. } vorhanden K. }	E. schwach M. keines K. vorhanden
0,2 % $(NH_4)_2SO_4$ und 2 % Zucker	E. gut M. überwiegend K. —	E. gut M. — K. überwiegend	E. sehr schwach M. keines K. einige
0,2 % $(NH_4)_2SO_5$ und 6 % Zucker	E. schwach M. sehr gering K. vorhanden	E. schwach M. gering K. vorhanden	E. schwach M. } in geringen K. } Maß. vorh.
1 % $(NH_4)_2SO_4$ + 0,2 % Zucker	E. schwach M. vorhanden K. in der Ueberzahl	E. gut M. } vorhanden K. }	E. schwach M. } vorhanden K. }
1 % $(NH_4)_2SO_4$ + 2 % Zucker	E. gut M. vorwiegend K. vorhanden	E. schwach M. vorhanden K. einige	E. sehr schwach K. sehr geringe Anzahl
1 % $(NH_4)_2SO_4$ + 6 % Zucker	E. sehr gut. M. gut entw. K. vorhanden	E. sehr gut M. normal entw. K. keine	E. nicht deutlich feststellbar
5 % $(NH_4)_2SO_4$ und 6 % Zucker	E. gut M. } vorhanden K. } (ähnlich den Formen bei Peptonzusatz)	E. schwach M. } vorhanden K. }	E. schwach K. vorhanden

zugleich auftreten. Bei geringerem Zuckerzusatz ist die Entwicklung eine schlechte, selbst wenn Ammoniumsulfat in genügender Menge vorhanden ist. Die beste Entwicklung des Myzels findet bei 1—3 % Ammoniumsulfat und bei einem Zuckergehalt von 4—5 % statt. Steigt der Zucker- und Ammoniumsulfatgehalt über eine gewisse Grenze (5—6 %), so entstehen Formen, die mit denen auf Pepton Aehnlichkeit besitzen. Ja sogar bei sehr reichlichem Zuckerzusatz (10 %) sind die Konidien ausschließlich vorhanden. Die Entwicklung war hier sehr schwach und es sind wohl osmotische Faktoren ausschlaggebend, denn die Konidien zeigten eine kleinere und unregelmäßigere Form als sonst.

Reichlicher Ammoniumsulfatgehalt bewirkt keine Konidienbildung.

Bedeutendere Unterschiede waren bei den Kulturen im Licht, im Dunkeln und in der sauerstoffärmeren Atmosphäre nicht festzustellen; es ist nur zu bemerken, daß im letzteren Falle die Entwicklung ziemlich schwach war.

Wirksamer wurde dagegen die Entwicklung noch bei erhöhtem Sauerstoffzusatz gehemmt. Auf Agar-Agar war sie eine so minimale, daß die beobachteten Konidien zum guten Teil von der Impfung herstammen können. Man kann nur feststellen, daß bei Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle eine Anreicherung der Luft mit Sauerstoff stark schädigend auf den Pilz wirkt.

Pepton als Stickstoffquelle.

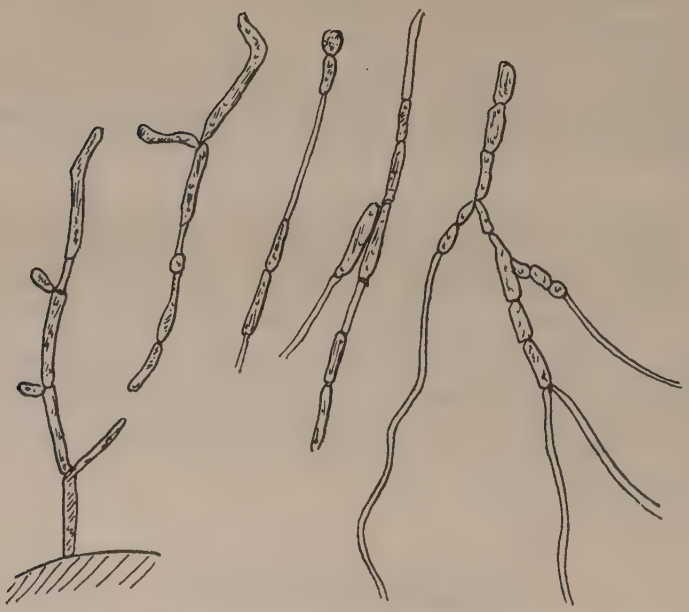
Die Kulturen mit Pepton unterscheiden sich von denen mit Ammoniumsulfat dadurch, daß sie sich auf gallertartigen

Nährböden nicht runzlich in die Höhe hoben, sondern schleimig ausbreiteten und meistens eine reiche Strahlenbildung (Fig. 1a) aufweisen. Die Entwicklung ist hier auch im allgemeinen weit reichlicher.

Aus der Rubrik D der im Dunkeln gezüchteten Kulturen ersieht man, daß die Wuchsformen von der Nährstoffkonzentration wesentlich abhängig sind.

Bei geringem Peptonzusatz (reine Gelatine oder 0,1 % Pepton) und nicht zu hohem Zuckergehalt tritt Myzel neben Konidien auf. Die Hyphen bestehen aus lang gestreckten Zellen; lange Teile davon sind entleert (Fig. 7). Hiermit hat

Figur 7.



Hyphen bei sehr geringem Eiweißzusatz.

man wohl jene Gebilde vor sich, die auch bei Ust. avenae

nach Beobachtungen Brefelds bei Nährstoffmangel auftreten.

Bemerkenswert ist, daß bei den Gelatinekulturen ohne besonderen Eiweißzusatz aber bei reicher Zuckerdarbietung (4 %) die peptonisierende Wirkung des Pilzes eine sehr starke ist. Während sonst eine Verflüssigung der Gelatine erst nach mehreren Wochen eintrat, so daß der Pilz selbst bei üppigstem Wachstum sich auf Gelatine gut kultivieren ließ, war hier schon nach einer Woche die Verflüssigung der Gelatine eine so starke, daß die Kulturen in den senkrecht gestellten Röhrchen herunterrutschten und unten in der Flüssigkeit in Konidien weiter vegetierten. Ich vermutete anfangs Verunreinigung durch Bakterien, doch hierauf zielende Beobachtungen und der Umstand, daß in 16 Röhrchen die Erscheinung gleichermaßen auftrat, zeigten, daß dies nicht der Fall war.

Bei einigermaßen größerem Peptongehalt (0,5 %) der Nährböden tritt nun die Konidienbildung stark hervor. Die Strahlenbildung ist gleichzeitig sehr deutlich ausgeprägt; es kommt also, wie gezeigt, zur Ausbildung jener dünnen Hyphen, die die Verbindung zwischen Konidienhäufchen herstellen. Steigt der Zuckergehalt (über 4 %), so ist die Strahlenbildung nicht mehr so ausgeprägt, ein Zeichen, daß jetzt jene dünnen Hyphen nicht mehr gebildet werden.

Es sind bei dieser Peptonkonzentration auch jene Reihenbildungen sehr häufig, die ich oben (S. 14 Fig. 2) beschrieben habe. Besonders gut sind sie in den Gelatinekulturen zu beobachten, treten aber auch in den Wasserkulturen, wenn auch nicht in gleicher Länge auf.

Bei noch stärkerem Peptonzusatz (ca. 1 % Pepton) sind

Kulturen mit Pepton als Stickstoffquelle.

Gelatinekulturen.

Ohne Peptonzusatz.

	D	L	H	O
0 % Zucker	Schwache Entwicklung, Konidien vorhand. Feine Strahlen auf u. in dem Substrat (Fig. 1a). Daneben Myzel mit langen u. z. T. entleerten Zellen.	ähnlich wie bei D, doch das Myzel nicht so lang	ähnlich wie bei D, doch die entleerten Teile länger	Schwache Entwickl. Keine einzelnen Konidien. Langes, verzweigtes Myzel, nicht verflochten, sondern aus einzeln. Zentr. ausstrahlend.
0,5 % Zucker	Gute Entwicklung. Starke Strahlenbild. Konidien, die oft in Reihen angeordnet sind (Fig. 2).	ähnlich wie bei D,	ähnlich wie bei D	Schwache Entwickl. Konidien und normales Myzel.
1 % Zucker	Gute Entwicklung. Nur Konidien.	ebenso wie D	ebenso wie bei D	Schwache Entwickl. Keine einzelnen Konidien. Langes normales Myzel.
4 % Zucker	Verflüssigung. Konidien.	ebenso wie bei D	ebenso wie bei D	Ebenso wie D.

0,25 % Pepton.

	D	L	H	O
0 % Zucker	Schwache Entwickl. Konidien einzeln und in langen Reihen mit langen entleerten Teilen.	ähnlich wie D	ähnlich wie D, Konidien in Reihen	Schwache Entwickl. In der Mitte Konid., sonst reiche Myzelentwicklung.
% 0,5 Zucker	Gute Entwicklung. Starke Strahlen. Nur Konidien.	ähnlich wie D	Gute Entwicklung. Bräunung. Konidien.	MäßigeEntwicklung. Keine Strahlen. Gutes sparriges, normales Myzel.
1 % Zucker	Sehr reiche Entwicklung, mit langen Strahlen, in und auf dem Substrat Konid.	ähnlich D	ähnlich D, doch treten die Strahlen nicht in die Gelatine	MäßigeEntwicklung. Konidien und Myzel.
4 % Zucker	MäßigeEntwicklung. Konidien.	ähnlich	ähnlich	Schwache Entw. Konidien und Myzel.

0,5 % Pepton.

	D	L	H	O
0 % Zucker	Schwache Entwicklung, spärliche Strahlung, Konidien.	ähnlich D	ähnlich D	Schwache Entwicklung. Konidien. Lange Hyphen.
0,5 % Zucker	Gute Entwicklung. Starke Strahlen, Konidien.	„	Gute Entwicklung. Sehr lange Strahlen. Konidien häufig in Reihen	Schwache Entwicklung. Konidien und Myzel.
1 % Zucker	Sehr reiche Entwicklung mit langen Strahlen. Nur Konidien.	„	Bräunung der Kultur sonst wie D	Gute Entwicklung. Mit kleinen Randstrahlen. Konidien einzeln und längere Zellverbände.
4 % Zucker	Sehr gute Entwicklung. Bräunung.	„	breiter gelber Strich, Konidien. Viele Reihen	Gute Entwicklung. Kultur hebt sich empor, etwas runzlig

3 % Pepton.

	D	L	H	O
0,5 % Zucker	Sehr gute Entwicklung mit vielen Strahlen. Nur Konidien.	ähnlich D	ähnlich D	Gute Entwicklung, ohne Strahlen. Keine einzelnen Konidien, sondern nur Reihen. Einzelne kurze Hyphen.
1 % Zucker	Sehr reiche Entwicklung ohne Strahlen. Konidien.	„	„	Starke Entwicklung. Konidien einzeln und in Reihen
4 % Zucker	Sehr starke Entwicklung. Konidien.	„	„	Starke Entwicklung. Kultur dick u. faltig. Konidien einzeln und in Reihen.

Wasserkulturen.

1 % Pepton.

	D	L	H	O
0,1 % Zucker	Gute Entwicklung, weißlicher Niederschlag. Nur Konidien	ebenso ähnlich wie D	Schwächere Entwicklung nur Konidien	Nicht sehr starke Entwicklung. Konidien
0,5 % Zucker	Gute Entwicklung, starker lockerer Bodensatz. Konidien vorherrschend, daneben viele kleine Verbände mit dünnen Ansätzen	ähnlich wie D	Gute Entwicklung. Gebräunter Niederschlag. Konidien einzeln und reihenweise	Gute Entwicklung Gebräunter Niederschlag. Nur Konidien, dovon viele rundlich
5 % Zucker	Gute Entwicklung gelblicher Niederschlag. Nur Konidien	ebenso wie D	Bräunlicher Niederschlag	Gelblicher Niederschlag. Nur Konidien, davon viele rund
10 % Zucker	Geringe Entwicklung. Konidien von unregelmäßiger Gestalt	ebenso wie D	ebenso wie D	ebenso wie D.

2 % Traubenzucker.

	D	L	H	O
0,1 % Pepton	Entwicklung sehr reichlich, Konidien daneben Myzel mit gestreckten Hyphen s. Fig. 7,	ähnlich wie bei D. doch ist d. Myz. nicht so gut ausgebildet	gute Entwcklung Konidien sind vorherrsch. Einige langgestreckte Zellreihen	Gute Entwicklung, Konidien, langgestrecktes Myzel vorherrschend
5 % Pepton	Sehr reichliche Entwicklung. Nur Konidien	ähnlich wie D.	gute Eentwickl. dicke geschwollene Konidien. Viele Zellreihen (s. Fig. 2)	Reichliche Entwicklung. Konidien vorhanden. Viele von runder Gestalt mit einem Schlauch ausgekeimt. Auch Myzel mit schlanken Hyphen Fig. 10
10 % Pepton	Schwache Entwicklung. Konidien	ebenso wie D.	gute Entw. reichl. Konid. viele davon rund und gebräunt	gute Entwicklung Konidien z. T. rundlich

die Konidien ausschließlich vorhanden. Die Zellreihen sind jetzt sehr kurz. Steigert man auch noch den Zuckergehalt, so nehmen die Kulturen auf Gelatine schon nach Verlauf von acht Tagen eine bräunliche Färbung an. Sonst trat diese Bräunung deutlich erst ein, wenn die Kulturen längere Zeit bestanden.

In den Wasserschälchen zeigten die Konidien zum Teil Formen, die von der gewöhnlichen Art abwichen. Während sonst die Konidien eine länglich runde Gestalt hatten, zeigten sie hier runde Form und waren oft von einer bräunlichen Haut umgeben, so daß sie den Brandsporen außerordentlich glichen und sich nur dadurch morphologisch von ihnen unterschieden, daß sie etwas durchsichtiger waren.

Daß die Konidien sich in älteren Kulturen braun färben, ist eine bekannte Tatsache; aber es handelt sich, wie bisher beobachtet, in diesem Falle um sogenannte Gemmenbildungen und diese Gemmen haben eine semmelförmige Gestalt, da sie aus zwei aneinander haftenden, stark geschwollenen, fettreichen Zellen bestehen. Die Sporen aber, die sich hier zeigten, waren einzeln und von der Größe der Brandsporen. Während es Herzberg nicht gelungen ist, bei Ust. Jensenii die Gemmen zum Auskeimen zu bringen, zeigt Fig. 10, wie eine rundliche gebräunte Konidie schon wieder mit einem kurzen Schlauch ausgekeimt ist.

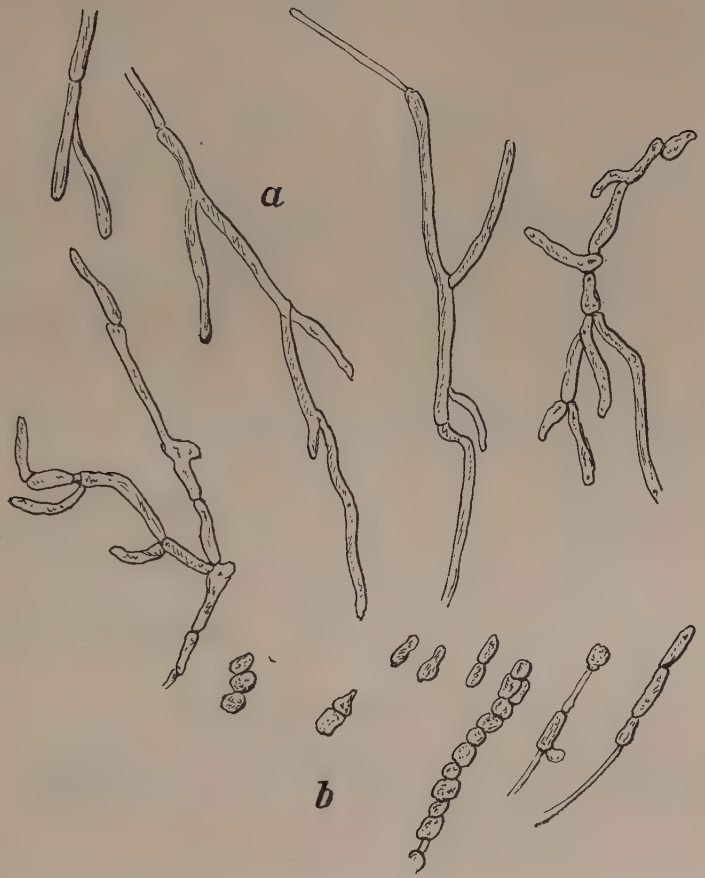
Es scheinen also bei hinreichend großem Pepton- und Zuckerzusatz Gebilde zu entstehen, die den Brandsporen sehr ähnlich sind. Findet doch auch in der Wirtspflanze die Anlage der Brandsporen im Blütenstande statt, also in einem Teile des Pflanzenkörpers, zu dem hin ein reichlicher Transport von Nährstoffen stattfindet.

Was die Unterschiede der Kulturen im Licht, im Dunkeln und in der an Sauerstoff ärmeren Luft betrifft, so ist nur zu sagen, daß sie nicht bedeutend waren. Es schien, daß die Entwicklung im Dunkeln etwas reichlicher stattfand als im Licht, ohne daß die Art der Entwicklung beeinflußt wurde. Auch zeigten die Kulturen in der sauerstoffarmen Atmosphäre deutlich eine etwas geringere Ausdehnung als die im Licht.

Bedeutendere Unterschiede traten mir aber bei den Kulturen in der mit Sauerstoff angereicherten Luft entgegen. Aus der Tabelle ersieht man, daß hier Myzel gebildet wird, wenn in der gewöhnlichen Luft auf demselben Nährboden Konidienbildung stattfindet. Die Kulturen unterscheiden sich schon äußerlich von den übrigen dadurch, daß die sonst so schön ausgebildete Strahlenbildung zurücktritt. Im Mikroskop zeigten sich Hyphen von ebenmäßiger, schlanker Form. Sie waren bisweilen sparrig verzweigt; entleerte Teile waren bei ihnen selten. So wichen sie deutlich von den stark septierten, zum Teil entleerten Hyphen ab, wie sie sonst in Peptonkulturen gefunden wurden. Sie glichen vielmehr jenen Hyphen, die ich bei den Ammoniumsulfatkulturen beobachtet habe. Fig. 8 stellt die Wuchsformen desselben Nährbodens (0,25 % Pept., 0,5 % Zuck.) in gewöhnlicher Luft und in der Sauerstoff reicheren Atmosphäre nebeneinander und zeigt die bedeutende Wirkung des Sauerstoffes.

Ferner sieht man aus der Tabelle, daß, wenn der Peptongehalt eine gewisse Grenze überschreitet, auch bei O Konidien gebildet werden. Auch der Zuckergehalt spielt eine Rolle. Wird er zu hoch, so verursacht er Konidien-

Figur 8.



a) Myzel bei Pepton als Stickstoffquelle in mit Sauerstoff angereicherter Luft.

b) Entsprechende Wuchsformen in Luft gewöhnlicher Zusammensetzung.

bildung bei Peptonkonzentrationen, bei denen sonst Myzel entsteht.

So ist festgestellt, daß der Sauerstoff Ust. Jensenii zur Ausbildung eines Myzels veranlaßt, sobald der Gehalt an

Eiweiß und Traubenzucker eine gewisse Grenze nicht überschreitet.

Kulturen auf Zellulose.

Da der Pilz in der Pflanze stets in Gegenwart der Zellulose der Zellwände wächst und diese bei seinem Vordringen oft durchbrechen muß, wollte ich sein Verhalten auch bei der Kultur auf diesem Stoff prüfen. Zu diesem Zweck überzog ich Objektträger mit einer Schicht gereinigten Fließpapiers und stellte sie schräg in kleine Glaszylinder, die oben durch eine Schale geschlossen waren. In den Zylindern wurde die Nährlösung (0,5 % Pep., 1 % Zucker) bis zu einer Höhe von ungefähr 1 cm gegossen; sie sog sich dann an dem Fließpapier weit hinauf. Geimpft wurde das Papier in der Höhe des Flüssigkeitsspiegels. Ein Teil der Zylinder wurde in eine mit O angereicherte Atmosphäre gebracht. Versuchstemperatur ca. 20 ° C.

Nach 10 Tagen war die Entwicklung gut vorgeschritten. Man sah, daß der Pilz an dem Fließpapier hinaufgeklettert war und das Papier stellenweise mit einem gelblichen, flachen Belag überzogen hatte. Auch hier war der Unterschied der Kulturen in der sauerstoffreichen Luft und der in gewöhnlicher Luft ein sehr deutlicher. Während die letzteren eine Höhe von 1,5 cm erreicht hatten, waren die ersteren um die doppelte Strecke emporgeschoben. — Der gelbe, häufchenweis angeordnete Belag stellt sich unter dem Mikroskop in beiden Fällen als ein dichtes Konglomerat von Konidien dar. Gut entwickelte Hyphen waren nicht zu entdecken. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß sie, wenn

auch in der dünnen Form (S. 14 u. 15, Fig. 2 u. 3) vorhanden waren; denn anders läßt sich das Hinaufschieben der Kultur in getrennten Häufchen nicht erklären. Die Hyphen sind wohl nur so fein, daß sie sich mit der Nadel nicht losreißen ließen und daß sie sich, wenn man das Papier zerzupfte, unter den Fasern des Papiers nicht unterscheiden ließen. — Die größere Höhe der Sauerstoffkulturen deutet wieder daraufhin, daß bei größerem Sauerstoffgehalt der Luft die Tendenz, sich länger auszudehnen, auftritt.

Unterschiede des Wachstums auf saurem, neutralem und alkalischem Nährboden.

Schon Herzberg hatte beobachtet, daß die Ustilagineen die Eigenschaft besitzen, die Nährlösung besonders bei Anwesenheit von Pepton zu alkalisieren. Auch ich machte die Beobachtung, daß z. B. in einer Pepton-Dextrose-Wasserkultur, die anfangs ziemlich sauer reagierte, nach 2 Monaten eine deutlich alkalische Reaktion nachzuweisen war. Ich nahm deshalb Veranlassung zu untersuchen, ob die Wuchsform des Pilzes vielleicht von der Art der Reaktion abhängig wäre.

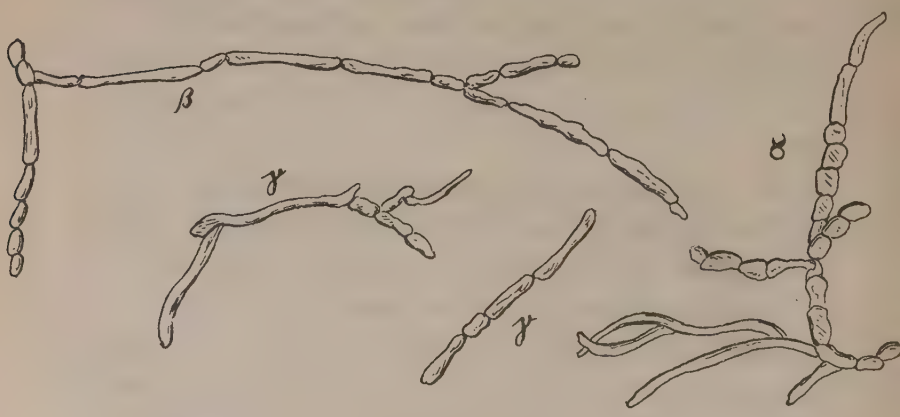
Zu diesem Zwecke setzte ich Wasserkulturen in Doppelschälchen an und benutzte als Nährmittel 0,5 % Pepton und 0,8 % Dextrose. Ich nahm nur diesen einen Nährboden, da ich aus den früheren Versuchen wußte, daß bei ihm eine Neigung zur Myzelbildung vorhanden ist. Aus der Grundflüssigkeit (S. 9) wurde jetzt das Kalziumchlorid fortgelassen; denn bei der Neutralisation mit Natriumkarbonat fiel das Ca als $CaCO_3$ heraus und verursachte nur, daß die

Flüssigkeit trübe wurde und daß das Natriumkarbonat in zu reichlicher Menge zugesetzt werden mußte. Trotzdem das Kalzium für Pilze als nicht notwendig angegeben wird, setzte ich dennoch in Rücksicht auf die früheren Kulturen eine geringe Menge $CaCO_3$ hinzu.

Die Nährlösung war infolge des Gehaltes an Monokaliumphosphat an sich ziemlich sauer. Ich säuerte infolgedessen nicht weiter an. Neutralisiert wurde mit Natriumkarbonat, so daß eine schwach alkalische Reaktion zu beobachten war. Die alkalische Lösung wurde erhalten, indem ich noch einmal so viel Natriumkarbonat hinzusetzte, als ich zur Neutralisation gebraucht hatte. Ein Teil der Schälchen wurde in eine mit Sauerstoff angereicherte Luft gebracht. Versuchstemperatur ca. 18° C.

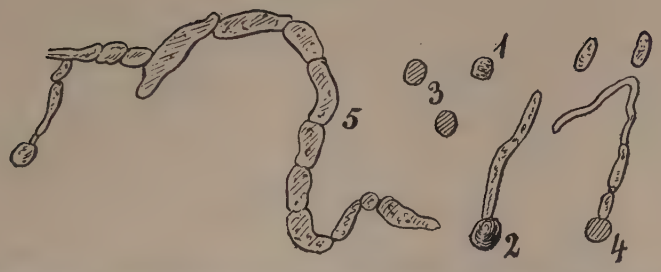
Nach acht Tagen wurde beobachtet. In den sauren Lösungen fanden sich nur Konidien, in den neutralen dagegen waren neben Konidien recht gut ausgebildete Hyphen

Figur 9.



Myzelbildung α) in neutraler Lösung. β) Myzelbildung in Sauerstoff-Luft. γ) Myzelbildung in saurer Lösung in Sauerstoff-Luft.

Figur 10.



Wuchsformen aus einer Kultur mit 5% Pepton und 2% Zucker in O. Brandsporen ähnliche Konidien.
1 und 2 gebräunt. 3 und 4 nicht gebräunt. 2 und 4 ausgekeimt.
5 gleichzeitig auftretendes Myzel.

zu beobachten (Fig. 9α). — Die Kulturen, die in der an Sauerstoff reichen Atmosphäre gestanden hatten, zeigten in der sauren Lösung Konidien und kurze hyphenartige Verbände (Fig. 9γ); in der neutralen dagegen war ein Myzel in sehr schöner reicher Weise ausgebildet, wie ich es vorher nicht beobachtet hatte (Fig. 9β). — Die alkalischen Lösungen hatten sich beim Sterilisieren braun gefärbt; in ihnen war die Entwicklung eine außerordentlich schwache.

Es scheint demnach, daß eine schwach alkalische Reaktion des Nährmittels auf die Myzelbildung begünstigend wirkt, und zwar in außerordentlichem Maße, wenn die Luft einen größeren Sauerstoffgehalt als gewöhnlich besitzt. Eine stark alkalische Reaktion der Nährlösung wirkt schädigend auf die Entwicklung des Pilzes.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit hat erstens gezeigt, daß Ustilago Jensenii eine große Formenmannigfaltigkeit entwickeln kann. Es finden sich ovale, normal ausgebildete Konidien (Fig. 1), zylindrische Hyphenzellen (Fig. 7), große, fettreiche, reihenweis angeordnete Zellen (Fig. 2), schmale, vielfach entleerte Zellverbände (Fig. 4), schließlich regelmäßig ausgestaltete, schlanke Hyphen (Fig. 8). Zwischen diesen Typen gibt es naturgemäß mannigfache Uebergänge, so daß das Bild einer Kultur im allgemeinen ein wechselvolles ist.

2. Physiologisch interessant erscheint mir die Tatsache, daß Ustilago Jensenii bei geringem Eiweiß- und reichlichem Zuckergehalt des Nährmediums eine stark eiweißlösende Wirkung ausübt, daß also der Pilz seine Stoffwechselprodukte in einer für ihn günstigen Weise abzuändern vermag.

3. Für die Entwicklung des Pilzes ist auch die Tatsache bemerkenswert, daß er nicht die Fähigkeit besitzt, dichtere Zellulosemassen wie die des Fließpapiers in besonderem Maße anzugreifen. Seine Fähigkeit, Zellulose zu lösen, scheint also nur für die dünnen Zellmembrane junger Zellen auszureichen. Wir haben hierin vielleicht einen der Gründe, warum der Pilz nur in jungen Zellen fortkommt und in älteren Gewebepartien zugrunde geht.

4. Was nun die anfangs gestellte Frage nach den Ursachen der Myzelbildung betrifft, so haben sich, wenn ich

von der Wirkung des Ammoniumsulfates absehe, zwei Faktoren als Veranlassung der Myzelbildung herausgestellt, der Sauerstoff und die alkalische Reaktion. Es wurde festgestellt, daß ein reichliches, normal ausgebildetes Myzel nur dann entsteht, wenn der Pilz in einer an Sauerstoff etwas angereicherten Atmosphäre wächst. Die Hyphen, die hier auftreten, sind kräftig entwickelt und verschieden von den dünnen, entleerten Hyphen, wie sie z. B. bei Nahrungsmangel entstehen. Die Bedingung für die Ausbildung eines guten Myzels ist dabei die, daß Eiweiß nicht in zu reichlichem Maße geboten wird. — Eine schwach alkalische Reaktion unterstützt die Wirkung des Sauerstoffs in bedeutendem Maße.

Daß der Sauerstoff bei der Ausbildung von Fortpflanzungsorganen wirksam ist, ist mehrfach beobachtet worden (Pfeffer, Pflanzenphys. II S. 135). Es wird für Pilze jedoch angegeben, daß ein größerer Sauerstoffgehalt der Luft die Bildung von Fortpflanzungsorganen befördert. Wir haben hier einen Fall, wo gerade das Umgekehrte eintritt.

Ist nun anzunehmen, daß die oben angegebenen Faktoren auch in der Gerstenpflanze wirksam sind? Was den Sauerstoffgehalt anbetrifft, so ist festgestellt, daß er in lebenden Zellen tatsächlich im Ueberfluß vorhanden ist (Pfeffer I S. 547). Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß der Pilz, der ja möglichst in der Nähe des Scheitels vegetiert, unter dem Einfluß dieses Ueberschusses steht. Aber auch in den Interzellularen ist besonders bei guter Beleuchtung der Sauerstoffgehalt ein bedeutenderer als in der atmosphärischen Luft, so daß auch eine Einwirkung von dieser Seite her möglich ist (Pfeffer I S. 187).

Die alkalische Reaktion ist dem gesamten Zellinhalt der Gerste nicht eigen. Gerstenpreßsaft rötete im Gegenteil blaues Lackmuspapier. Dem Plasma soll ja in den meisten Fällen eine alkalische Reaktion zukommen (Pfeffer I S. 490). Das Ueberwiegen der Säure müßte also dem Zellsaft zuzuschreiben sein. Nun wächst der Pilz besonders in jungem Gewebe. Junge Zellen sind aber vornehmlich mit Plasma gefüllt. — Aber auch abgesehen hiervon, ist oben festgestellt, daß der Pilz selber bei Anwesenheit von Eiweißstoffen die Nährflüssigkeit alkalisch macht. Er schafft sich also in den Zellen durch seinen eigenen Stoffwechsel die die Myzelbildung fördernde Reaktion. Diese kann mit der Zeit zu intensiv werden und nun wiederum bewirken, daß der Pilz in älteren Pflanzenteilen abstirbt.

Hiernach halte ich es in hohem Maße für wahrscheinlich, daß die Ausbildung des Myzels in der Gerste durch den Sauerstoffüberschuß im Innern der Wirtspflanze und durch die alkalischen Stoffwechselprodukte des Pilzes selber wirksame Förderung erfährt.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Geheimen Regierungsrat Professor Dr. Kny meinen aufrichtigen Dank auszusprechen für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, und für die Bereitwilligkeit, mit der er mir die Mittel des Pflanzenphysiologischen Institutes zur Verfügung gestellt hat. Auch Herrn Professor Dr. Gaßner, der mich auch auf diese Untersuchungen hingewiesen hat, sei an dieser Stelle bestens gedankt.